

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. Januar 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/007943 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 31/404**,
C07D 209/34, A61P 35/00

(74) Anwalt: **FITZNER, Uwe**; Lintorfer Str. 10, 40878 Ratingen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/07778

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. Juli 2002 (12.07.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 34 196.2 13. Juli 2001 (13.07.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **FORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE GMBH** [DE/DE]; Hermann-von-Helmholtz-Platz 1, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen (DE);

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **CHIRCHIN, Vladimir** [MD/DE]; Karlstr. 26, 76351 Linkenheim (DE). **ATHANASSIOS, Giannis** [DE/DE]; Moltrechtstr. 23, 04316 Leipzig (DE). **MAZITSHEK, Ralph** [DE/DE]; Marienstr. 68, 76137 Karlsruhe (DE). **SLEEMAN, Jonathan** [GB/DE]; Hagwaelde 12, 76646 Bruchsal (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: KINASE INHIBITORS AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: KINASE INHIBITOREN UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to protein kinase inhibitors of formulas (I), (II) and (III) and to the use thereof for treating diseases that were triggered by pathological signal transduction cascades.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Proteinkinase-Inhibitoren der Formeln I, II und III und ihre Verwendung zur Behandlung von Krankheiten, die durch pathologische Signaltransduktionskaskaden ausgelöst wurden.

WO 03/007943 A1

Kinase Inhibitoren und deren Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft Protein-Kinase-Inhibitoren und deren Verwendung zur Behandlung von Krankheiten, die durch pathologische
5 Signaltransduktionskaskaden ausgelöst wurden.

Proteinkinasen sind zu den Transferasen gehörende Enzyme, welche die Übertragung von Phosphatresten des Adenosin-5'-Triphosphats (ATP) oder Guanosin-5'-Triphosphats (GTP) auf Proteine katalysieren. Nach den
10 Aminosäure-Resten, auf die die Phosphatgruppe übertragen wird, unterscheidet man z. B. Protein-Serin/Threonin-Kinasen, Protein-Histidin-Kinasen, Protein-Aspartat-Kinasen oder Protein-Tyrosin-Kinasen.

Proteinkinasen spielen eine entscheidende Rolle in der Regulierung der
15 Aktivität der Akzeptorproteine (Signaltransduktionskaskade). Signale von außerhalb der Zelle werden durch Zelloberflächen-Rezeptoren, wie z. B. Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) aufgenommen (Ullrich et al. 1990, Cell, 61: 203-212; Fantl et al., 1993, Annu. Rev. Biochem., 62: 453-481). Durch die Bindung von „signalgebenden“ Molekülen oder sogenannten
20 Effektoren oder Liganden, werden die RTKs autophosphoryliert (Weiss et al., 1997, Curr. Opin. Genet. Div., 7:80-86). Diese Autophosphorylierung erlaubt es den RTKs mit anderen Proteinen, u.a. sogenannten Adapter-Proteinen eine Wechselwirkung einzugehen (Robertson et al., 2000, Trends Genet., 16: 268-271). Diese Proteinkomplexe sind ihrerseits in der
25 Lage, andere intrazelluläre Proteine zu aktivieren, was zu einer ganzen Kette von Proteininteraktionen führt, wodurch das ursprünglich extrazelluläre Signal von der Zelloberfläche bis in den Zellkern übertragen wird (Treisman et al., 1996, Curr. Opin. Cell. Biol., 8:205-215; Tan et al., 1999, Trends Genet., 15:1456-149). Das übertragene Signal ist somit in
30 der Lage, die Genexpression, den Zellzyklus oder andere wichtige Zellfunktionen zu beeinflussen.

- Zu den Effektoren der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehören beispielsweise Insulin und viele Wachstumsfaktoren, wie z. B. die Wachstumsfaktoren der Blutplättchen (PDGF) oder epidermale Wachstumsfaktoren (EGF).
- 5 Rezeptor-Tyrosin-Kinasen spielen u.a. eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) oder neuer lymphatischer Gefäße (Lymphangiogenese). Hierbei werden Endothelzellen von bereits existierenden Gefäßen angeregt, zu wachsen, zu sprossen und sich auszudehnen, um neue Kapillargefäße zu bilden. In
- 10 diesem Zusammenhang sind insbesondere die Zelloberflächen-Rezeptoren VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) und FGFR (fibroblast growth factor receptor) sowie als Effektoren entsprechende Wachstumsfaktoren der VEGF-Familie oder FGF-Familie zu nennen (Korpelainen et al., 1998, Curr. Opin. Cell. Biol., 10: 159-164;
- 15 Malonne et al., 1999, Clin. Exp. Metastasis., 17:1-14). Weitere bekannte Beispiele für natürliche angiogene Effektoren (Liganden) sind u.a. der Tumor-Necrosis-Faktor (TNF- α), Interleukin 8 oder der sogenannte Tie2-Ligand (Malonne et al., 1999, Clin. Exp. Metastasis., 17:1-14).
- 20 Die unkontrollierte Stimulierung von Proteinkinasen kann zu pathologischen Prozessen, wie z. B. Krebs führen (Porter et al., 1998, Oncogene, 17: 1343-1352). Beispielsweise kann ein genetisch veränderter Rezeptor, also eine mutierte Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die auch in Abwesenheit eines geeigneten Effektors konstitutiv Signale an
- 25 andere Proteine weiterleitet, zur Entstehung von Krebs führen. Solche Aktivierungsmutationen von RTKs sind mit einer Vielzahl menschlicher Erkrankungen verknüpft (Robertson et al., 2000, Trends Genet., 16: 268-271). So sind beispielsweise konstitutiv aktive FGF-Rezeptoren für eine Vielzahl von Erbkrankheiten verantwortlich (Tabelle 1). Die inkorrekte
- 30 Regulation der Angiogenese spielt eine wichtige Rolle im Verlauf einer großen Anzahl von Krankheiten, die in Tabelle 2 aufgeführt sind (Malonne

et al., 1999, Clin. Exp. Metastasis., 17:1-14). So haben im Fall von Krebserkrankungen verschiedene Studien ergeben, daß Tumoren in kritischer Weise von einer ausreichenden Blutversorgung abhängig sind. Wenn die Angiogenese gehemmt werden kann, kann auch das
5 Tumorwachstum gestoppt oder sogar revertiert werden (Zetter et al., 1998, Annu. Rev. Med., 49: 407-424). Auch die Induktion der Lymphangiogenese spielt eine wichtige Rolle bei Krebserkrankungen und Filariasis (Skobe et al., 2000, Nature Med., 7: 192-198; Rao et al., 1996, J. Parasitol., 82: 550-556).

10

Die Regulation der Proteinkinase-Aktivität von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen kann im Prinzip auf unterschiedliche Weise erfolgen. So können beispielsweise Antikörper eingesetzt werden, welche die Interaktion der Rezeptor-Kinase/Liganden-Bindung blockieren (Brekken et al., 2000,
15 Cancer Res., 60: 5117-5124; Klement et al., 2000, J. Clin. Invest., Vol. 105, No. 8: 15-24). Alternativ ist der Einsatz löslicher extrazellulärer Rezeptorabschnitte zur Bindung des entsprechenden Liganden in einen inaktiven Komplex (Sequestrierung) bei Aiello et al. (1995, Proc. Natl. Acad. Sci, Vol. 92: 10457-10461) beschrieben. Sowohl die zuvor
20 genannten Antikörper als auch die löslichen Rezeptoranteile weisen jedoch erhebliche Nachteile auf. Beide werden schnell aus dem Kreislaufsystem entfernt. Ferner handelt es sich in beiden Fällen um sehr große Moleküle, deren Fähigkeit zur Gewebepenetration sehr limitiert ist. Ihre Herstellung, insbesondere die der Antikörper, für die pharmazeutische
25 Anwendung ist sehr aufwendig und teuer. Darüber hinaus repräsentieren sie Verbindungen, die eine Immunantwort auslösen können, so daß ihre biologische Effektivität stark abnimmt bzw. gänzlich außer Kraft gesetzt wird.

30 Eine weitere Möglichkeit die Aktivität von Protein-Kinasen zu regulieren, ist die Hemmung durch Substrat-ähnliche Verbindungen, die

beispielsweise mit dem natürlichen Substrat ATG oder GTP um die Substratbindedomäne konkurrieren. In diesem Zusammenhang sind Indolinone beschrieben, die zur Hemmung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) fähig sind. Kristallographische Studien an der speziellen RTK
5 Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) haben gezeigt, daß der Oxindol-Anteil der Indolinone mit der gleichen Bindungsstelle interagieren, wie der Adeninring des natürlichen Substrats ATP (Mohammadi, M. et al., Science, 276: 955-960). Allerdings bestimmt die chemische Struktur des Substituenten am C3-Atom des Oxindols darüber, welche RTK in ihrer
10 Aktivität gehemmt wird. Einige Indolinone blockieren die Aktivität einer einzigen RTK; andere Indolinone hemmen ein breiteres RTK-Spektrum.

Zur Behandlung von Krankheiten, bei denen die Aktivität von Proteinkinasen krankhaft außer Kontrolle geraten ist, ist es daher von
15 enormer medizinischer Relevanz, Verbindungen zur Verfügung zu stellen, mit denen diese unkontrollierte Aktivität von Oberflächen-Rezeptor-Proteinkinasen, vorteilhafterweise Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) reguliert, bevorzugt blockiert werden kann, um dadurch den Verlauf der Erkrankungen zu mindern oder sogar zu unterbinden. Krankheiten, bei
20 denen die Aktivität von Proteinkinasen krankhaft außer Kontrolle geraten ist, können z. B. Krebsarten sein, die durch eine unkontrollierte Zellvermehrung und/oder gestörte Apoptose hervorgerufen werden. Ferner kann es sich um Krankheiten wie z. B. Filariasis handeln oder um Krankheiten, die durch gestörte Vorgänge bei der Angiogenese und/oder
25 Lymphangiogenese hervorgerufen werden (siehe dazu auch Tabelle 2). Wünschenswert ist in diesem Zusammenhang auch die Bereitstellung von Verbindungen, die über die natürliche Aktivität oder krankhaft veränderte (konstitutive) Aktivität von Proteinkinasen direkt die Angiogenese und/oder Lymphangiogenese blockieren, so daß einerseits die Blutversorgung des
30 Tumors verschlechtert oder sogar unterbunden wird, wodurch es zu einer Eindämmung des Tumorwachstums oder einem Absterben des

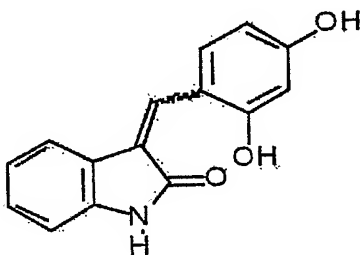
krankhaften Gewebes kommt bzw. andererseits eine Metastasierung von Tumorzellen verhindert wird.

Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung in vorteilhafter Weise
5 gelöst.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verbindungen, welche die Aktivität von Proteinkinasen, die an einer unkontrollierten Zellvermehrung und/oder einer gestörten Apoptose von Zellen und/oder der Angiogenese
10 und/oder Lymphangiogenese und/oder Angiogenese- und/oder Lymphangiogenese-abhängigen Erkrankungen und/oder Filariasis beteiligt sind, hemmen und ein am C3-Atom substituiertes Derivat von Indolin-2-on darstellen, ausgewählt aus einer Gruppe von Verbindungen der allgemeinen Strukturformel

15

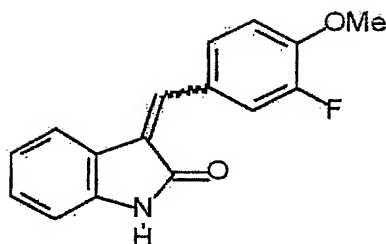
I)



oder

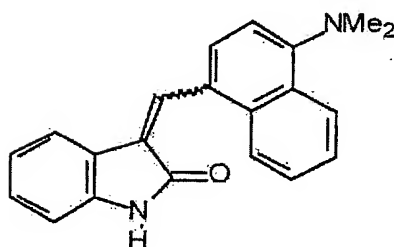
20

II)



5 oder

III)



10

oder Salzen der Verbindungen I) – III).

Diese Verbindungen werden im Laufe der Beschreibung auch mit MAE87
(= Strukturformel I), MAE106 (= Strukturformel II), MAZ51 (=

15 Strukturformel III) bezeichnet. Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist
ferner eine Verbindung mit der Bezeichnung MAZ51-2, die als Salz der
Verbindung MAZ51 eine löslichere Variante mit ansonsten vergleichbaren
Eigenschaften von MAZ51 darstellt.

In einer vorteilhaften Variante der vorliegenden Erfindung handelt es sich um Verbindungen, welche die Aktivität von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen blockieren, die an der Angionese und/oder Lymphangiogenese beteiligt sind. In einer weiteren Variante hemmen die erfindungsgemäßen
5 Verbindungen, einzeln oder deren Kombination, die Aktivität von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aus der Gruppe VEGFR-3 (Vascular Endothelial Cell Growth Factor Receptor), VEGFR-2, Tie2, EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), ErbB2, IGF1R und FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor). Eine vorteilhaften Variante der
10 Erfindung umfaßt Verbindungen, welche die Aktivität des Zelloberflächenrezeptors VEGFR-3 blockieren.

Im Sinne der Erfindung hemmen die Verbindungen neben der natürlichen Aktivität von Proteinkinasen auch die Aktivität von pathologisch
15 veränderten Proteinkinasen, d.h. von Proteinkinasen, deren Aktivität krankhaft außer Kontrolle geratenen ist. Beispielsweise können die Proteinkinasen dauerhaft (konstitutiv) stimuliert sein. Dies kann durch veränderte Eigenschaften im Interaktionsverhalten mit Liganden (Effektoren), oder anderen Proteinkomponenten oder eine veränderte
20 Autostimulierung der RTKs ausgelöst worden sein.

Unter pathologisch veränderten Proteinkinase-Varianten sind im Sinne der vorliegenden Erfindung beispielsweise Proteinkinasen zu verstehen, die durch Veränderungen auf Nukleinsäure- und/oder Proteinebene eine
25 unkontrollierte Zellvermehrung und/oder eine gestörte Apoptose von Zellen bewirken und/oder zu einer gestörten Angiogenese und/oder Lymphangiogenese und den damit verbundenen Krankheiten führen (siehe Tabelle 2) und/oder an der Krankheit Filariasis beteiligt sind. Unter Veränderungen auf Nukleinsäureebene sind erfindungsgemäß Mutationen
30 zu verstehen, wozu z. B. Deletionen, Insertionen oder Austausche einer oder mehrerer Nukleotide zu verstehen sind. Unter Veränderungen auf

Proteinebene sind Deletionen, Insertionen oder Austausche einer oder mehrerer Aminosäuren zu verstehen.

Das Wirkprinzip der erfindungsgemäßen Verbindungen beruht darauf, daß
5 sie das natürliche Substrat der Proteinkinasen, beispielsweise ATP, vortäuschen. D.h. sie wirken sozusagen als ATP-Analoga. Dabei binden sie mit ihrem Oxindol-Anteil an die gleiche Domäne der Proteinkinasen, an die natürlicher Weise der Adeninring des ATPs bindet. Die erfindungsgemäßen Verbindungen und das natürliche Substrat
10 konkurrieren somit um die Substratbindestelle, d.h. die erfindungsgemäßen Verbindungen verdrängen das ATP von der Substratbindestelle. Aufgrund dessen können die Proteinkinasen keinen Transfer einer Phosphatgruppe auf ein Zielmolekül katalysieren und so ihre bestimmungsgemäße Funktion als Kinase nicht mehr ausüben. Die
15 erfindungsgemäßen Verbindungen sind somit aufgrund ihrer Struktur in der Lage nicht nur generell die Aktivität von Proteinkinasen zu hemmen, sondern auch menschliche Erkrankungen zu behandeln, die durch mutierte (konstitutiv) aktive RTKs hervorgerufen werden. Hierbei ist der Einsatz jeder einzelnen Verbindungen, aber auch deren Kombinationen
20 denkbar.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen die Vorteile auf, daß es sich um kleine Moleküle handelt, die eine sehr gute Zell- bzw. Gewebepenetranz aufweisen. Ferner sind sie sehr gut zur Verabreichung
25 am Patienten, bevorzugt oral, geeignet. Außerdem ist die Herstellung der Verbindungen auch im großtechnischen Maßstab für den pharmazeutischen Einsatz einfach und kostengünstig. Besonders vorteilhaft ist darüber hinaus, daß diese Verbindungen keine Immunantwort auslösen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Mittel enthaltend wenigstens eine erfindungsgemäße Verbindung der zuvor genannten Art zur Behandlung von Erkrankungen, an deren Entstehung, Verlauf, Linderung und/oder Heilung natürlich vorkommende und/oder pathologisch veränderte Proteinkinasen beteiligt sind. Dies umfaßt 5 erfindungsgemäß Mittel zur Hemmung der unkontrollierten Vermehrung und/oder Induzierung der Apoptose von Zellen und/oder zur Hemmung der Angiogenese und/oder Lymphangiogenese enthaltend wenigstens eine Verbindung der zuvor genannten Art. Ferner sind die 10 erfindungsgemäßen Mittel enthaltend wenigstens eine erfindungsgemäße Verbindung zur Behandlung von Angiogenese- und/oder Lymphangiogenese-abhängigen Erkrankungen (wie z.B. in Tabelle 2 aufgeführt) und/oder Filriasis geeignet.

Die zuvor genannten Mittel zeichnen sich ferner dadurch aus, daß sie 15 wenigstens eine Verbindung der erfindungsgemäßen Art in einer Konzentration von etwa 1-20, bevorzugt von etwa 2-15, besonders bevorzugt von etwa 3-10 und insbesondere von etwa 4-8 mg/kg Körpergewicht des Probanden enthalten. Denkbar sind auch Kombinationen der erfindungsgemäßen Verbindungen in frei 20 kombinierbaren Konzentrationsanteilen der genannten Bereiche.

Erfindungsgemäß umfaßt sind auch Mittel enthaltend wenigstens eine Verbindung der zuvor genannten Art zur Regulierung der biologischen Funktion von Proteinen, die ihrerseits durch Proteinkinasen, die wiederum 25 durch die erfindungsgemäßen Verbindungen gehemmt werden, hinsichtlich ihrer Aktivität kontrolliert werden (Signaltransduktion).

Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Mittel zusätzliche Stoffe enthalten, die zur besseren Verarbeitung oder Verabreichung am 30 Patienten erforderlich der geeignet sind. Diese Stoffe ebenso wie die

Herstellungsverfahren für die erfindungsgemäßen Mittel sind gängige Laborpraxis und werden deshalb hier nicht näher erläutert.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der
5 Verbindungen der zuvor genannten Art zur Herstellung von Mitteln zur
Hemmung der unkontrollierten Vermehrung und/oder Induzierung der
Apoptose von Zellen und/oder zur Hemmung der Angiogenese und/oder
Lymphangiogenese. Ebenso ist die Verwendung der erfindungsgemäßen
Verbindungen zur Behandlung von Angiogenese- und/oder
10 Lymphangiogenese-abhängigen Erkrankungen(Tabelle 2) und/oder
Filariasis umfaßt.

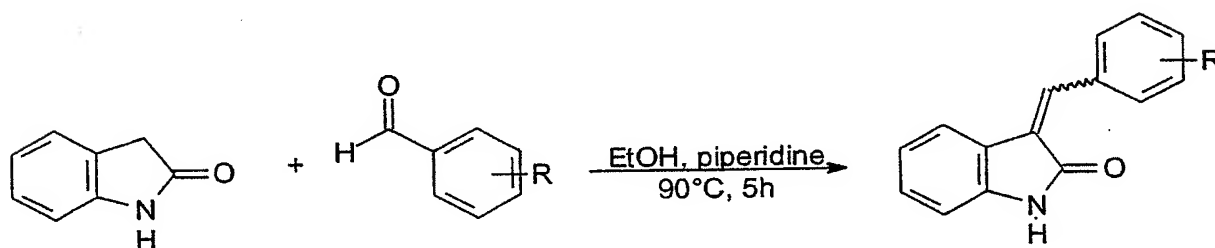
Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der vorliegenden Erfindung, wirken sich jedoch nicht limitierend auf die Erfindung aus:

1) Struktur und Synthese von MAE87, MAE106 und MAZ51

5

Allgemeine Vorschrift:

10 mmol Oxindol, 10 mmol Aldehyd und einige Tropfen Piperidin werden in 40 ml Ethanol gelöst. Die Reaktionsmischung wird 5 Stunden bei 90°C gerührt. Das gewünschte Produkt (E/Z-Gemisch) fällt während der
10 Reaktion oder nach Abkühlen auf Raumtemperatur aus. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.



15

Die NMR Spektren wurden auf einem Bruker DRX500 Spektrometer aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm (parts per million) angegeben. Als interner Standard dient das Restprotonensignal des Lösungsmittels. Hochauflösende Massenspektren wurden mit einem
20 Finnigan MAT MS 70 Massenspektrometer aufgenommen. Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

1a) 3-(2,4-Dihydroxy-benzyliden)-1,3-dihydro-indol-2-on (MAE87)

25 Eine Mischung von 1,33 g Indol-2-on (10mmol), 1,38 g 2,4-Dihydroxybenzaldehyd (10mmol) und 3 Tropfen Piperidin werden in 40 ml Ethanol für 5 Stunden rückflusiert. Während der Reaktion fällt das

gewünschte Produkt als gelber Feststoff aus. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird das Produkt abfiltriert, mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute 1,28 g (51%).

5 Schmelzpunkt: 250°C Zersetzung

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆):

δ [ppm]: 6,38 (dd, J = 2 Hz, J = 8,5 Hz, 1H); 6,44 (d, J = 2 Hz, 1H); 6,85 (m, 2H); 7,17 (t, J = 7,5 Hz, 1H); 7,55 (d, J = 8,3 Hz, 1H); 7,63 (d, J = 7,6
10 Hz, 1H); 7,7 (s, 1H); 10,2 (br, 2H); 10,45 (s, 1H)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆):

δ [ppm]: 102,9; 107,4; 110,2; 113,1; 121,3; 122,2; 122,3; 123,5; 129,2;
131,2; 133,4; 142,5; 159,2; 161,7; 169,7

15

HR-MS: C₁₅H₁₁NO₃: ber.: m/z = 253,0739 gef.: m/z = 253,0744

1b) 3-(3-Fluoro-4-methoxy-benzyliden)-1,3-dihydro-indol-2-on (MAE106)

20

Eine Mischung von 1,33 g Indol-2-on (10mmol), 1,54 g 3-Fluor-4-methoxy-benzaldehyd (10mmol) und 3 Tropfen Piperidin werden in 40 ml Ethanol für 5 Stunden rückflusiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur fällt das gewünschte Produkt als gelber kristalliner Feststoff aus. Das Produkt wird
25 abfiltriert, mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute 2,2 g (82%).

Schmelzpunkt: 220°C

30 ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, E/Z-Isomere):

δ [ppm]: 3,92 (s, 3H); 6,83 (d, $J = 7,2$ Hz, 0,7H); 6,87 (m, 0,7H); 6,98 (t, $J = 7,6$ Hz, 0,7 H); 7,18-7,32 (m, 2H); 7,54 (s, 0,3H); 7,6 (m, 1H); 7,65 (d, $J = 7,6$ Hz, 0,6H); 7,74 (s, 0,7 H); 8,0 (d, $J = 8,3$ Hz, 0,7 H); 8,80 (dd, $J = 2$ Hz, $J = 13$ Hz, 0,6 H); 10,65 (br, 1H)

5

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6):

δ [ppm]: 109,8; 110,6; 113,6; 114,3; 117,4; 117,6; 118,9; 119,0; 119,9; 121,3; 121,5; 121,6; 122,6; 125,5; 125,7; 121,1; 127,2; 127,5; 127,6; 127,7; 127,8; 129,1; 130,5; 121,1; 135,1; 136,2; 140,9; 143,3; 148,7; 148,8; 149,5; 149,6; 150,0; 150,6; 151,9; 152,5; 167,8; 169,2

10

HR-MS: $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{NO}_2\text{F}$: ber.: $m/z = 298,9946$ gef.: $m/z = 298,9954$

15

1c) 3-(4-Dimethylamino-naphthalen-1-ylmethylen)-1,3-dihydro-indol-2-on
(MAZ51)

Eine Mischung von 1,33 g Indol-2-on (10mmol), 1,99 g 4-Dimethylamino-1-naphtaldehyd (10mmol) und 3 Tropfen Piperidin werden in 40 ml Ethanol für 5 Stunden rückflusiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur fällt das gewünschte Produkt als orangener Feststoff aus. Das Produkt wird abfiltriert, mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute 2,67 g (85%).

25

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6):

δ [ppm]: 2,90 (s, 6 H; $(\text{CH}_3)_2$); 6,74 (dt, $J = 1$ Hz, $J = 7,5$ Hz, 1 H); 6,87 (d, $J = 7,5$ Hz, 1 H); 7,15 (m, 2 H); 7,24 (d, $J = 8$ Hz, 1 H); 7,59 (m, 2 H); 7,83 (d, $J = 8$ Hz, 1 H); 7,93 (m, 1 H); 8,06 (s, 1 H); 8,23 (m, 1 H); 10,64 (br, 1 H, -NH).

30

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6):

δ [ppm]: 45,1; 110,4; 113,4; 121,4; 121,7; 122,7; 125,2; 125,3; 125,4; 126;
127,4; 128,1; 128,2; 128,3; 130,2; 132,8; 134,1; 143,2; 153,1; 169

5 HR-MS: $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$: ber.: $m/z = 314,1419$ gef.: $m/z = 314,1419$

Schmelzpunkt: 250°C Zersetzung

10 2) MAE87, MAE106 und MAZ51 inhibieren eine breite Anzahl von
Rezeptor-Tyrosin-Kinasen im in vitro Tyrosin-Kinase-Assay.

Inhibitor		Kinase						
Name	Konz.	VEGFR-3	VEGFR-2	Tie2	EGFR	ErbB2	IGF1R	FGFR1
MAE87	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-9	-46	+1	-70	-45	-63	-50
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-74	-77	-65	-86	-84	-94	-94
MAE106	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	+1	+21	-5	-5	+4	-10	+5
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-57	-58	-28	-64	-41	-71	-1
MAZ51	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-4	-8	-7	-25	-11	-10	+1
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-35	-74	-27	-58	-39	-68	-5

15 Die Hemmung verschiedener Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in vitro durch
MAE87, MAE106 und MAZ51 wurde untersucht. Die Inhibitoren wurden in
2 verschiedenen Konzentrationen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) untersucht. Die
Inhibition ist in % angegeben. „+“ = Stimulation der Kinaseaktivität relativ
zur Kontrolle,

20 „-“ = Inhibition der Kinaseaktivität relativ zur Kontrolle.

Die Aktivität der RTK-Inhibitoren wurden mit Hilfe eines ELISAs bestimmt.
In diesem Assay werden die entsprechenden Kinasen als rekombinante

GST-Fusionsproteine (Glutathione S-Transferase) eingesetzt. Als Akzeptor dient synthetisches polyGlu,Tyr 4:1. Die Fähigkeit verschiedener Konzentrationen der Testsubstanzen die RTK-vermittelte Phosphorylierung des o. g. Akzeptors zu inhibieren wurde bewertet. Alle Tests wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

ELISA-Platten wurden über Nacht mit 0,2 mg/ml polyGlu,Tyr 4:1 in 100 mM Bicarbonat-Puffer (pH 9,6) beschichtet. Diese Lösung wurde entfernt und die Mikrotiterplatten mit TBS-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH8.1, 100 mM NaCl) zweimal gewaschen, und anschließend mit 5% BSA/TBS 30 min. geblockt. 50 µl Testsubstanz (2 oder 20 µg/ml in 10% DMSO), 25 µl GST-Kinase in 4x Kinase-Puffer (200 mM HEPES, 100 mM NaCl, 80 µM Na₃VO₄ und 0.04% BSA) wurden vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl 160 µM ATP (in 40 mM MnCl₂) als Substrat der Kinasen gestartet. Die Endkonzentrationen der Testverbindungen ist damit 1 oder 10 µg/ml in 5% DMSO. Die GST-Fusionsproteine wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt. VEGFR-2 50 NG/well, VEGFR-3 300 ng/well, Tie2 300 ng/well, EGFR 50 ng/well, ErbB2 200 ng/well, IGF-1R 50 ng/well, FGFR1 200 ng/well. Die Reaktionsmischung wurde 90 min. bei 30°C inkubiert. Die Kinasereaktion wurde durch Zugabe von 50 µl/well 30 mM EDTA gestoppt. Die Mikrotiterplatten wurden zweimal mit 0,05% Tween20/TBS gewaschen. Anti-Phosphotyrosin Antikörper (1:500) wurde in 0,05% Tween20/TBS (mit 0.5% BSA, 0.025% Magermilchpulver und 100 µM Na₃VO₄) zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Mikrotiterplatten wurden dreimal mit 0,05% Tween20/TBS gewaschen. Anschließend wurde der HRP-konjugierte Nachweisantikörper (1:1000) in 0,05% Tween20/TBS (mit 0.5% BSA, 0.025% Magermilchpulver und 100 µM Na₃VO₄) zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Mikrotiterplatten wurden dreimal mit 0,05% Tween20/TBS gewaschen. ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulphonat)) Substrat (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde zugegeben. Die OD wurde mit einem ELISA-reader bei 405 nm bestimmt.

3) MAE87, MAE106 und MAZ51 inhibieren die Liganden-induzierte Autophosphorylierung der RTKs VEGFR-2 und VEGFR-3

5 VEGFR-2 bzw. VEGFR-3 exprimierende PAE Zellen (Pig Aorta Endothel Cells) wurden mit 0,5 μ M, 5 μ M oder 50 μ M der entsprechenden Testverbindung inkubiert. Die Zellen wurden dann mit VEGF (VEGFR-2) oder VEGF-C (VEGFR-3) bzw. ohne Wachstumsfaktor als
10 Negativkontrolle stimuliert. Nach 15 min wurden die Zellen geerntet und mit VEGFR-2 oder VEGFR-3 immunopräzipitiert. Die Immunopräzipitate wurden nach Elektrophorese geblottet und mit anti-Phosphotyrosin Antikörper untersucht. Die Blots wurden abgezogen und zur Ladungskontrolle mit VEGFR-2 oder VEGFR-3 Antikörper untersucht. Bei 5 μ M inhibiert MAZ51 selektiv VEGFR-3.

15 PAE/VEGFR-2 oder PAE/VEGFR-3 wurden in 15 cm Gewebekulturschalen ausgesäht und bis 50% Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden dann 16-24 h (PAE/VEGFR-2) oder 72 h (PAE/VEGFR-3) in serumfreiem Medium (mit 0,2% BSA) gehungert. Nach 30-60 min
20 Vorinkubation mit 5ml 1mM serumfreiem Medium (1mM Na_3VO_4) und verschiedenen Inhibitorkonzentrationen wurden die Zellen 5 min. (VEGFR-3) oder 8 min. (VEGFR-2) bei 37°C stimuliert. Danach wurden die Zellen schnell zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen (mit 1mM Na_3VO_4) und mit eiskaltem modifiziertem RIPA Puffer (30 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM
25 NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% (v/v) Triton X100, 0.5% (w/v) Natriumdesoxycholat, 10 mM NaF) frisch zubereitet mit 1 mM PMSF, 0.1 U/ml Aprotinin, 10 ng/ml Leupeptin und 5 mM Na_3VO_4 lysiert. Die Zellen werden von den Platten mit Hilfe eines Rubber-Policeman geerntet und in Zentrifugenröhrchen auf Eis gesammelt. Die Lysate wurden zur
30 Solubilisierung durch eine Spritze mit einer 25G Kanüle gedrückt und zur

Abtrennung unlöslicher Bestandteile bei 4°C/13000rpm 15 min zentrifugiert.

Die klaren Lysate wurden über Nacht mit 4µg anti-VEGFR-2 (C-1158, Santa Cruz) oder anti-VEGFR-2 Antikörper (M20, Santa Cruz) bei 4°C inkubiert.

Zum Ausfällen des Rezeptor-Antikörper-Komplexes wurden 30µl/Röhrchen Protein A-Sepharose (Amersham) zugegeben und für weitere 2 Stunden bei 4°C inkubiert.

Die Sepharose wurden dann 1 min. bei 4°C zentrifugiert und dreimal mit kaltem Waschpuffer Puffer (30 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% (v/v) Triton X100, 0.5% (w/v) Natriumdesoxycholat, 10 mM NaF) frisch zubereitet mit 1 mM PMSF, 0.1 U/ml Aprotinin, 10 ng/ml Leupeptin und 5 mM Na₃VO₄ gewaschen. Der Rest des Waschpuffers wurde durch Absaugen durch eine, mit einer 27G Kanüle versehenen, Spritze entfernt. Die Sepharosekügelchen wurden in 50 µl SDS-Ladepuffer resuspendiert, aufgekocht und auf ein 6%iges Agarosegel geladen. Nach der elektrophoretische Auftrennung wurden die Proteine mittels Western Blot auf einer entsprechenden Membran fixiert. Die Blots wurden zuerst mit Hilfe eines anti-Phosphotyrosin Antikörpers (RC20:HRPO, Becton Dickinson) untersucht, dann wurde der erste Antikörper wieder entfernt um den Blot mit spezifischen anti-Rezeptor Antikörpern auf die Proteinladung zu untersuchen. Zum Ablösen des ersten Antikörpers wurde die Membranen mit Ablösepuffer (62.5 mM Tris, pH 6.8, 2% SDS, 0.75% 2-Mercaptoethanol) bei 55°C 20 min geschüttelt. Die Membranen wurden dann zweimal mit TBST je 2 min gewaschen und wie üblich geblockt und inkubiert.

Das Ergebnis ist in Figur 1 dargestellt.

4) MAE87, MAE106 und MAZ51 inhibieren die Endothelzell-Proliferation

Menschliche Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) wurden 24 h unter Serumentzug kultiviert. Dann wurden die Zellen 2 h mit den entsprechenden Verbindungen vorinkubiert und anschließend für weiter 24 h mit VEGF (MAE87) oder bFGF (MAE106, MAZ51) in Gegenwart der Inhibitoren kultiviert. Die Zellen wurden dann mit ^3H -Thymidin inkubiert. Die in die zelluläre DNA inkorporierte Menge Radioaktivität wurde gemessen. Alle Experimente wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

HUVE-Zellen wurden in 100 μl /well (10^5 Zellen/ml) in 96-well Zellkulturplatten ausgesäht und über Nacht ruhen lassen. Die Zellen wurden dann für 24 h mit 50 μl /well serumfreiem Medium gehungert. Nachfolgend wurden 50 μl verschiedener Konzentrationen der Testsubstanzen in serumfreiem Medium (enthält 2% DMSO) zugegeben und 2 h bei 37°C inkubiert. Das die Testverbindungen enthaltene Medium wurde entfernt und durch 50 μl frisches Medium mit bFGF (12,5 ng/ml) oder VEGF (100 ng/ml) ersetzt. Frische Verdünnungen der zweifach konzentrierten Testsubstanzen in serumfreiem Medium mit 2% DMSO wurden in 50 μl /well zu den Zellen gegeben. Die Endkonzentration DMSO war immer 1%. Nach 24 h wurde ^3H -Thymidin (1 μCi /well) zugegeben und die Zellen wurden für weitere 4-6h inkubiert. Zur Analyse der inkorporierten Radioaktivität wurden die Zellen 30 min trypsinisiert und mit Hilfe eines Harvester 96 cell (Tomtec) geerntet und auf einem Glasfasermembran-Filter fixiert. Die immobilisierte Radioaktivität wurde mit Hilfe eines MicroBeta TriLux Flüssigszintillations-Lumineszenzzählgeräts quantifiziert. Das Ergebnis ist in Figur 2 dargestellt.

5) MAE87, MAE106 und MAZ51 inhibieren die Angiogenese im CAM-Assay

Der Chorioallantoismembran-(CAM)-Assay wurde wie beschrieben (Wernert et al.) mit Hühnerembryonen 5 Tage nach der Befruchtung

durchgeführt. Methylcelluloseplättchen (Durchmesser 2mm) mit 100µg Inhibitor wurden auf die CAMs appliziert. Die Auswertung erfolgte am Tag 7. Repräsentative Ergebnisse sind für MAE106 in Figur 3 gezeigt. A. Negativkontrolle B. MAE106 behandeltes Ei. Das stark verzweigte Netzwerk von Blutgefäßen, das die Negativkontrolle zeigt, ist im MAE 106 behandelten Ei stark unterentwickelt.

6) MAE87, MAE106 und MAZ51 inhibieren die Proliferation von Tumorzellen

Die Zellen der Ratten Tumorzelllinie (Nestl et al., 2001, Cancer Research 61: 1569-1577) wurden 24 h in der Anwesenheit von 1% DMSO (Lösungsmittel Kontrolle), 2,5 µM oder 10 µM des Indolinons kultiviert. Tritiiertes Thymidin wurde dem Medium während der letzten 4-6 h der Inkubation zugefügt. Die Zellen wurden geerntet und die Menge an, in die DNA inkorporierter, Radioaktivität wurde quantifiziert. Die Daten sind in Prozent bezüglich der Proliferation der nur mit DMSO behandelten Zellen angegeben (% bezüglich Kontrolle; siehe Figur 4)). MAZ51 hatte den stärksten Inhibitorischen Effekt.

7) MAE87, MAE106 und MAZ51 induzieren Apoptose in Endothelzellen und Tumorzellen

Menschliche Endothelzellen (HDMEC) und Ratten Pankreas-Tumorzellen (1AS) wurden resuspendiert (10^5 Zellen/ml). 50 µl Zellsuspension wurden in 96-well Zellkulturplatten ausgesäht und 24h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann mit den angegebenen Konzentrationen der verschiedenen Inhibitoren für weitere 24h inkubiert. Der pro-apoptotische Effekt der Verbindungen wurde mit dem Cell Death Detection ELISA^{plus} kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Das kit enthält einen photometrischen Enzym-Immunoassay für

die qualitative und quantitative in vitro Bestimmung von, durch aktiven Zelltod (Apoptose) freigesetzten, cytoplasmatischen Histon-assoziierten DNA-Fragmenten (Mono- und Oligonucleosome). Über die Bestimmung der Optischen Dichte bei 405 nm läßt sich der Anteil an induzierter Apoptose quantifizieren. Die Meßwerte bezogen auf die unbehandelten Zellen sind gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen. Die Ergebnisse in Figur 5 zeigen, daß MAZ51 ein potenter Aktivator der Apoptose sowohl in Endothelzellen als auch Tumorzellen ist.

Die Zellen von der Ratten Tumorzelllinie (Nestl et al., 2001, Cancer Research 61: 1569-1577) wurden 24 h in der Anwesenheit von 1% DMSO (Lösungsmittel Kontrolle), 2,5 µM oder 10 µM des Indolinons kultiviert. Apoptose wurde mit Hilfe von anti-DNA-Peroxidase Antikörper quantifiziert. Die Menge an Farbstoff, der in einer durch die Peroxidase katalysierten chromogenen Reaktion erzeugt wird, wurde photometrisch bei 405nm gemessen und mit der Menge an Apoptose-assoziierten cytoplasmatischen Mono- und Oligonucleosomen korreliert. Die Daten sind in % Apoptose bezüglich der Zellen der Lösungsmittelkontrolle (% bezüglich Kontrolle) angegeben (Figur. 6). MAZ51 ist der potenteste Apoptose-Induktor.

8) MAZ51 inhibiert das Wachstum von 1AS und MT450 Ratten-Karzinomen in vivo.

1AS Zellen (5×10^5) wurden subkutan in 2 Gruppen von BDX-Ratten (8 Ratten pro Gruppe) injiziert. Einer Gruppe wurde nachfolgend täglich 100µl/Tier DMSO, bis zum Abschluß des Experiments injiziert. Der anderen Gruppe wurden täglich 100µl/Tier MAZ51 (10mg/ml in DMSO), entsprechend 4-5 mg/kg, injiziert. Das Tumervolumen wurde regelmäßig nach der Injektion der Tumorzellen gemessen. Wie anhand von Figur 7 zu

sehen ist, wird durch die Behandlung mit MAZ51 das Wachstum von AS1-Tumoren in vivo wesentlich gehemmt.

- 5 MT450 Ratten Mammarkarzinomzellen wurden subkutan in Wistar Furth Ratten injiziert. Die Wirkstoffbehandlung mit 8mg/kg/Tag MAZ51 in 100% DMSO oder Lösungsmittelkontrolle (100% DMSO) wurde am Tag nach der Injektion der Tumorzellen begonnen. MAZ51 oder nur Lösungsmittel wurde täglich intraperitoneal injiziert. Jede Testgruppe umfaßte 8 Tiere. Die Tumore wurden alle 4-5 Tage vermessen. Die Mittleren
10 Tumolvolumen sind Figur 8 angegeben.

Legende zu den Tabellen und Figuren:

5 Tabelle 1: Übersicht über Aktivierungsmutationen verschiedener
Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und die dadurch ausgelösten
Krankheiten.

Tabelle 2: Übersicht über Angiogensese-abhängige Krankheiten

10 Figur 1: Western-Blot von Immunpräzipitationen (i.p.) von VEGFR-2
und VEGFR-3 aus PAE-Zellen, die mit MAE87, MAE106 und
MAZ51 behandelt wurden. (-) stellt die Kontrolle dar (nicht
stimulierte Zellen); (+) sind Wachstumsfaktor-stimulierte
Zellen, die ohne bzw. mit 0,5 µM, 5 µM oder 50 µM des
entsprechend angegebenen Inhibitors (MAE87, MAE106
oder MAZ51) behandelt wurden. Die zur Immunpräzipitation
15 eingesetzten Antikörper-Proben (probe) ist entweder Anti-
Phosphotyrosin-Antikörper (anti-phospho-Y), Anti-VEGFR-2-
Antikörper (anti-VEGFR-2) oder Anti-VEGFR-3-Antikörper
(anti-VEGFR-3).

20 Figur 2: Messung des (³H)-Thymidineinbaus in humane endotheliale
Zellen (HUVEC) in Abhängigkeit von der Konzentration an
eingesetzten Inhibitoren (MAE87, MAE106 und MAZ51). Die
Hemmung der Zellproliferation durch MAE87, MAE106 und
MAZ51 ist dabei Dosis-abhängig.

25 Figur 3: Hemmung der Angiogenese in einer Chorioallantois
Membran (CAM). A: Scheinbehandelte Zellen (Kontrolle). B:
Mae106-behandelte Zellen der CAM.

30 Figur 4: Messung des (³H)-Thymidineinbaus (in %) in Ratten-
Tumorzelllinien (ASML, 1AS, G, AT6.1, MTLN3, MTLY,

NM081 und MT450) in Abhängigkeit von der Konzentration an eingesetzten Inhibitoren. Die Hemmung der Zellproliferation durch MAE87, MAE106 und MAZ51 ist Dosis-abhängig.

5

Figur 5: Nukleosom-ELISA-Test (Cell Death Detection ELISA). Dargestellt ist das Ausmaß abgestorbener Zellen der jeweiligen Zelllinie (als relative Absorption bei 405 nm) im Verhältnis zum Einsatz der Inhibitoren MAE87, MAE106 und MAZ51 und MAZ51-2. MAZ51 induziert den Zelltod in humanen endothelialen Zellen (HDMEC) und der Ratten Pankreaszelllinie 1AS am effektivsten.

10

15

Figur 6: Nukleosom-ELISA-Test (Cell Death Detection ELISA). Dargestellt ist das Ausmaß abgestorbener Zellen der jeweiligen Ratten Tumorzelllinie (Apoptosis in %) im Verhältnis zum Einsatz der Inhibitoren MAE87, MAE106 und MAZ51. MAE87, MAE106 und MAZ51 induzieren den Zelltod in einer Reihe von Ratten-Karzinomzelllinien.

20

25

Figur 7: Darstellung des Tumolvolumens in Abhängigkeit von der Anzahl an Tagen nach der Tumorzellinjektion in Abhängigkeit von der Behandlung der Tumorzellen 1AS mit MAZ51. Die untersuchten Ratten zeigen, daß nach Behandlung der 1AS-Tumorzellen mit MAZ51 das Tumorstadium in vivo gehemmt wird.

30

Figur 8: Darstellung des Tumolvolumens in Abhängigkeit von der Anzahl an Tagen nach der Tumorzellinjektion in Abhängigkeit von der Behandlung der Tumorzellen MT450 mit MAZ51 und einer DMSO-Lösung (Negativkontrolle). Die untersuchten

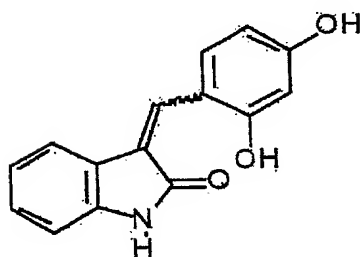
Ratten zeigen, daß nach Behandlung mit MAZ51 das Tumorwachstum der MT450-Tumorzellen in vivo gehemmt wird. \pm SE bedeutet die Standardabweichung des Tumolvolumens vom Mittelwert von 8 untersuchten Ratten pro Ansatz.

5

Ansprüche:

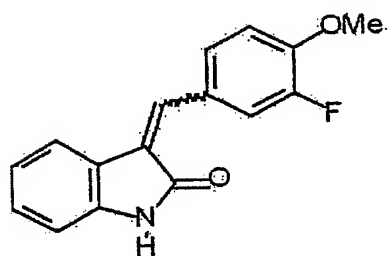
- 1) Verbindung, welche die Aktivität von Proteinkinasen, die an einer unkontrollierten Zellvermehrung und/oder einer gestörten Apoptose von Zellen und/oder der Angiogenese und/oder Lymphangiogenese und/oder Angiogenese- und/oder Lymphangiogenese-abhängigen Erkrankungen und/oder Filariasis beteiligt sind, hemmt und ein am C3-Atom substituiertes Derivat von Indolin-2-on darstellt, ausgewählt aus einer Gruppe von Verbindungen der allgemeinen Strukturformel

10 I)



oder

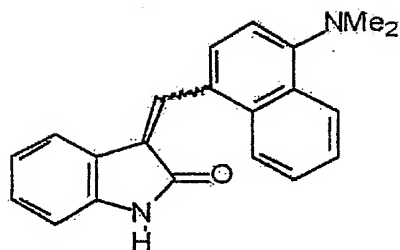
II)



15

oder

III)



oder Salzen der Verbindungen I) – III).

- 2) Verbindung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie
5 Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in ihrer Aktivität hemmt.
- 3) Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch
gekennzeichnet, daß sie Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aus der Gruppe
VEGFR-3 (Vascular Endothelial Cell Growth Factor Receptor),
10 VEGFR-2, Tie2, EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), ErbB2,
IGF1R und FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor) in ihrer
Aktivität hemmen.
- 4) Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch
15 gekennzeichnet, daß sie den Zelloberflächenrezeptor VEGFR-3 in
seiner Aktivität hemmt.
- 5) Mittel zur Hemmung der unkontrollierten Vermehrung und/oder
Induzierung der Apoptose von Zellen enthaltend wenigstens eine
20 Verbindung gemäß Anspruch 1.
- 6) Mittel gemäß Anspruch 5 zur Hemmung der Angiogenese und/oder
Lymphangiogenese.

- 7) Mittel gemäß einem der Ansprüche 5 oder 6 zur Behandlung von Angiogenese-abhängigen und/oder Lymphangiogenese-abhängigen Krankheiten und/oder Filariasis.
- 5 8) Mittel gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es wenigstens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 in einer Konzentration von etwa 1-20, bevorzugt von etwa 2-15, besonders bevorzugt von etwa 3-10 und insbesondere von etwa 4-8 mg/kg Körpergewicht des Probanden enthält.
- 10 9) Verwendung der Verbindungen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Herstellung von Mitteln zur Hemmung der unkontrollierten Vermehrung und/oder Induzierung der Apoptose von Zellen und/oder zur Hemmung der Angiogenese und/oder Lymphangiogenese.
- 15 10) Verwendung der Verbindungen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Behandlung von Angiogenese-abhängigen und/oder Lymphangiogenese-abhängigen Krankheiten und/oder Filariasis.
- 20

Tabellen und Figuren

Tabelle 1:

RTK	Krankheit
FGFR	Kraniosynostose Zwergwuchs Syndrom Lethales Zwergwuchs Syndrom
RET	Familiäres medulläres Schilddrüsenkarzinom Multiple endokrine Neoplasie Typ2
MET	Erbliches papilläres Nierenzellkarzinom
KIT	Gastrointestinale stromale Tumore Mastozytose
TIE2	Vaskuläre Fehlentwicklung

Tabelle 2:

Angiogenese-abhängige Krankheiten

Angiofibrom

Arteriovenöse Malformation

Arthritis

Atherosklerotische Plaques

Neovascularisation bei Hornhauttransplantation

Verzögerte Wundheilung

Diabetische Retinopathie

Granulationsbildung nach Verbrennung

Hämangioma

Haemophilie Gelenke

Hypertrophe Narben

Neovasculäres Glaucom

Schlechtheilende Frakturen

Osler-Weber Syndrom

Psoriasis

Progenisches Granulom

Retrolentale Fibroplasie

Sklerodermie

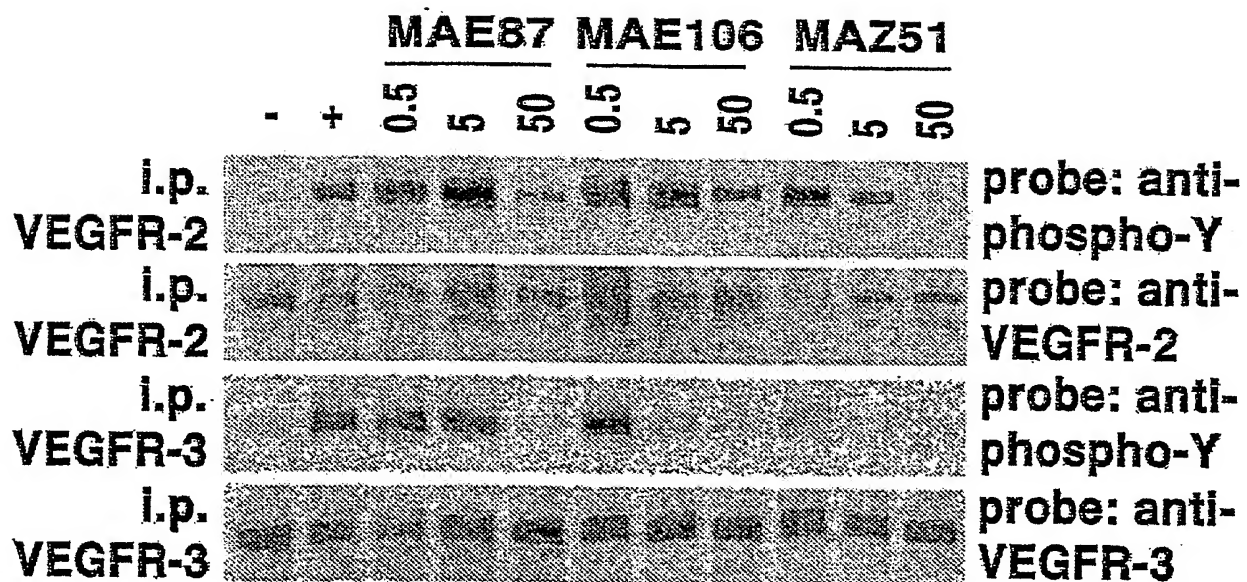
Tumorbildung und Metastasierung

Trachoma

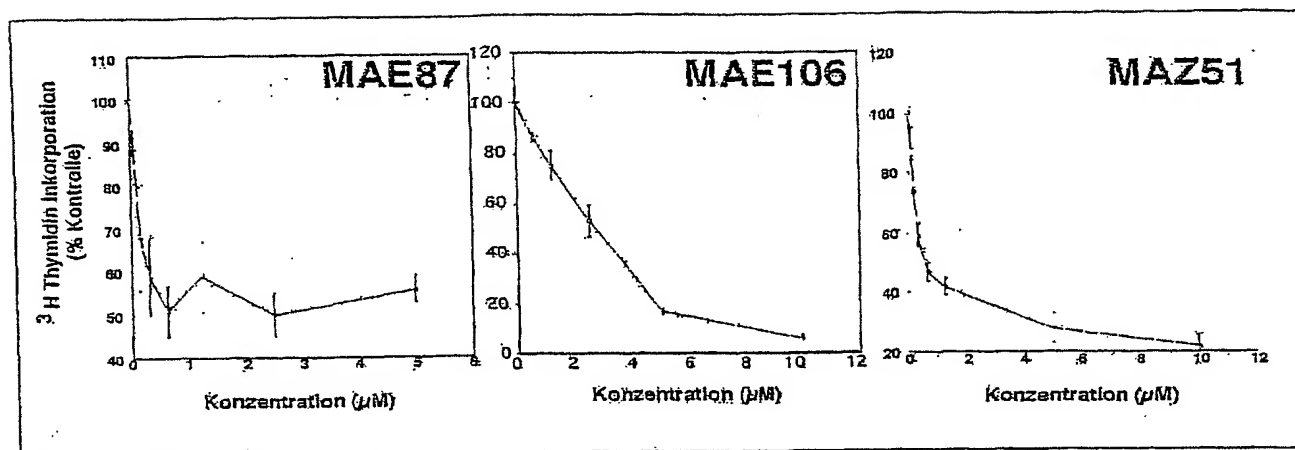
Vasculäre Adhäsion

Von Hippel-Lindau Syndrom

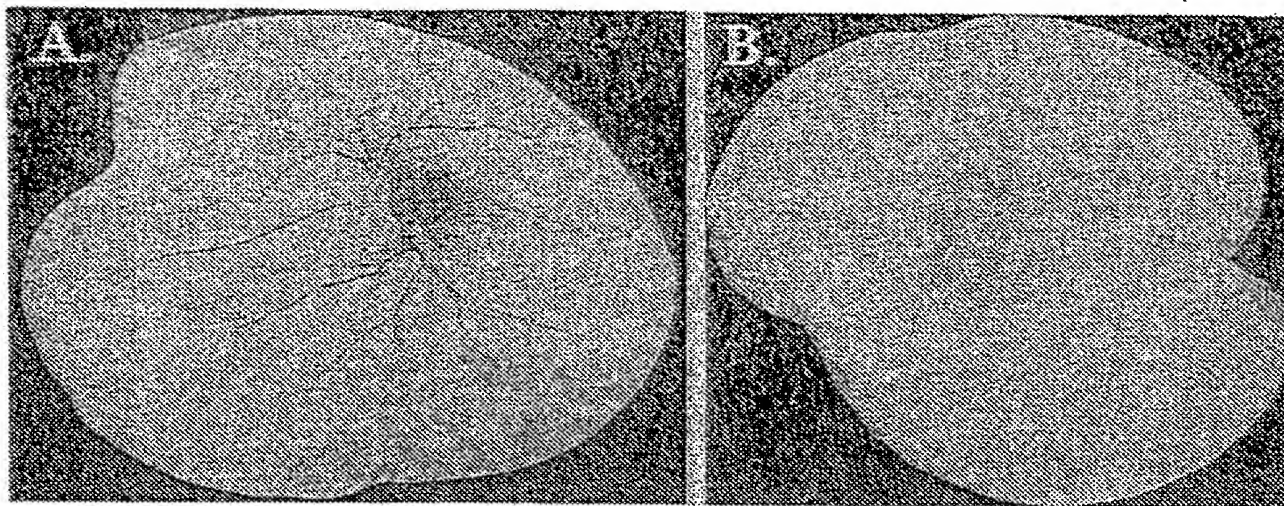
Figur 1:



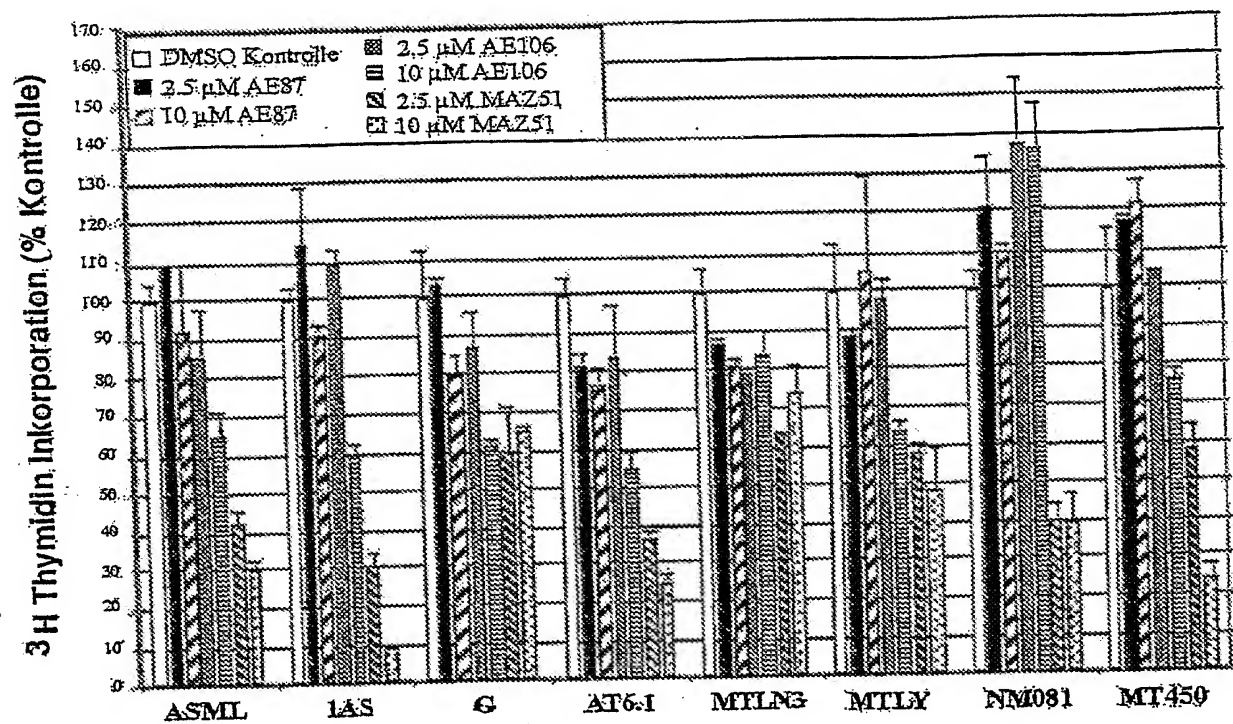
Figur 2:



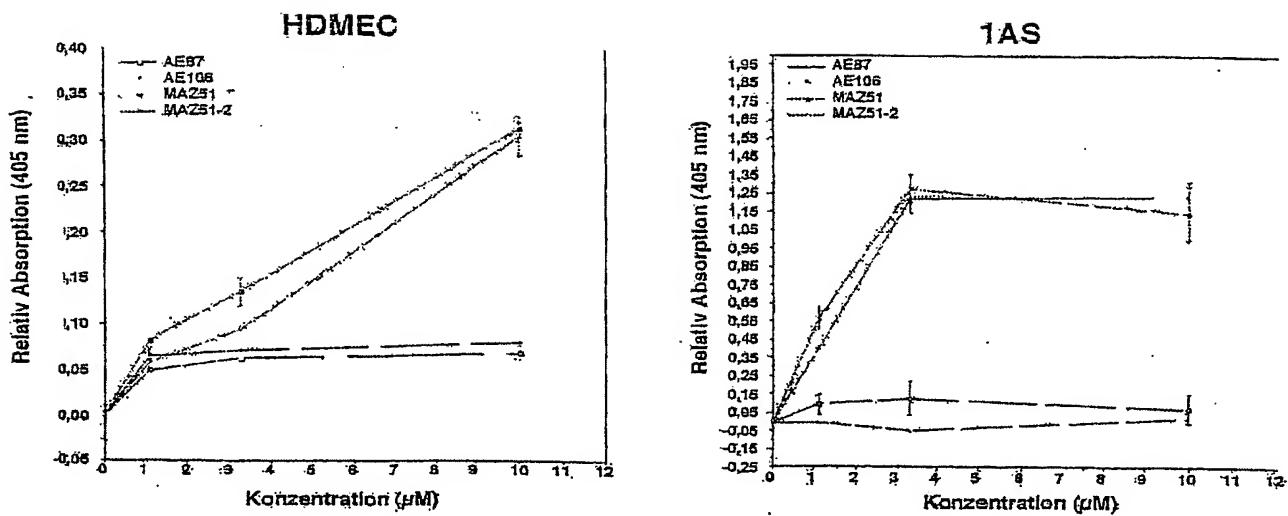
Figur 3:



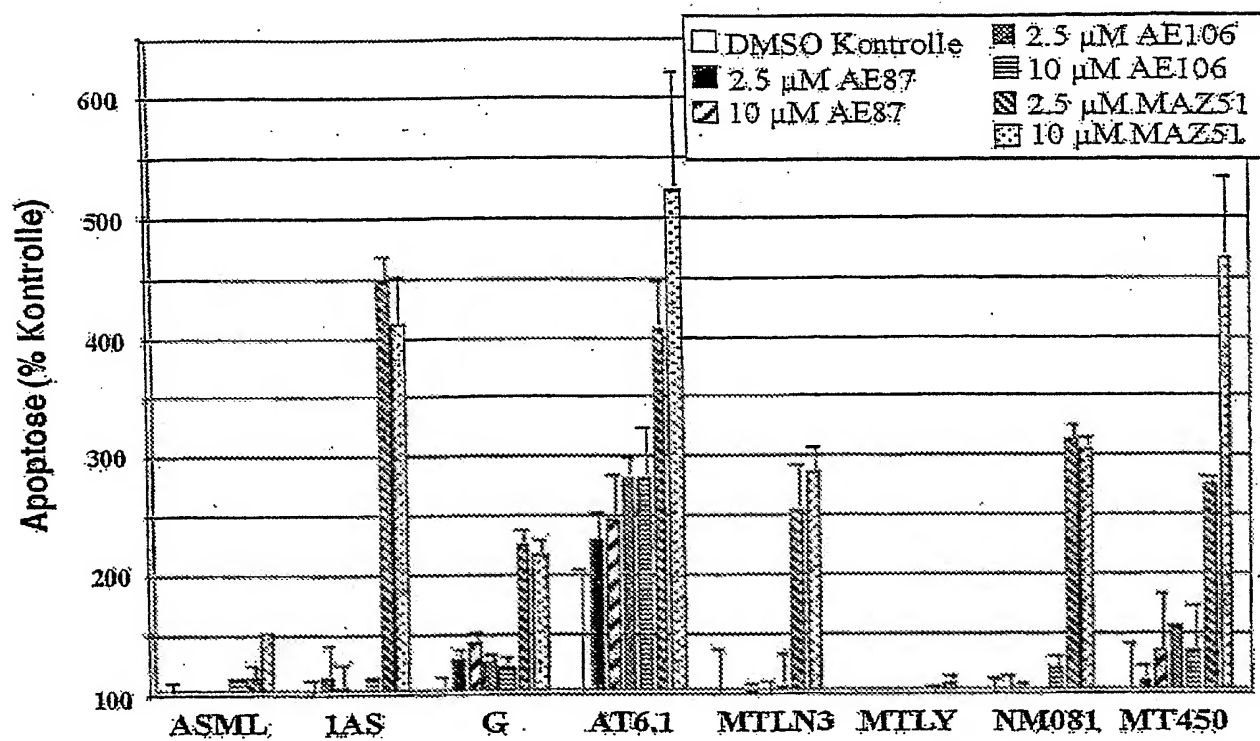
Figur 4:



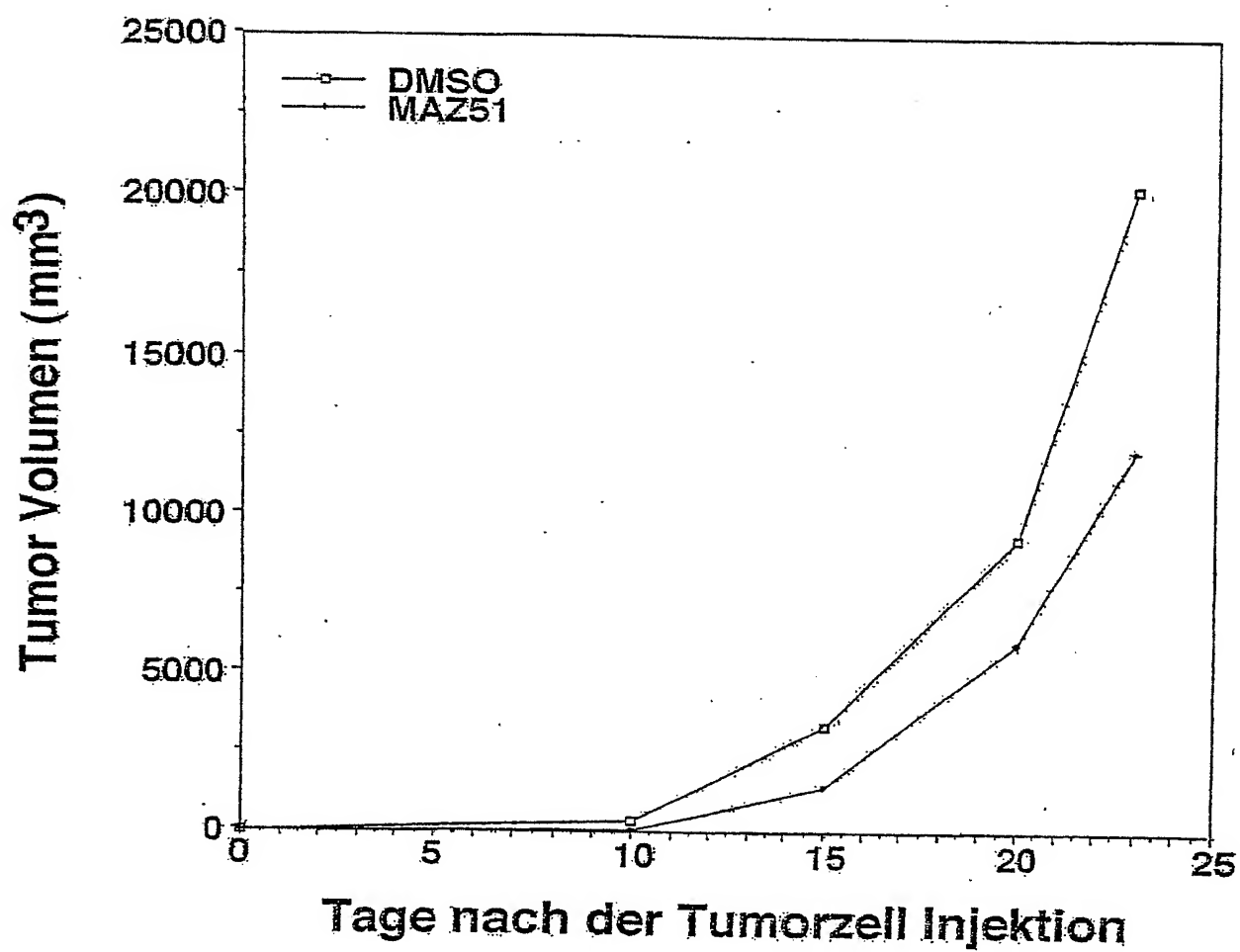
Figur 5:



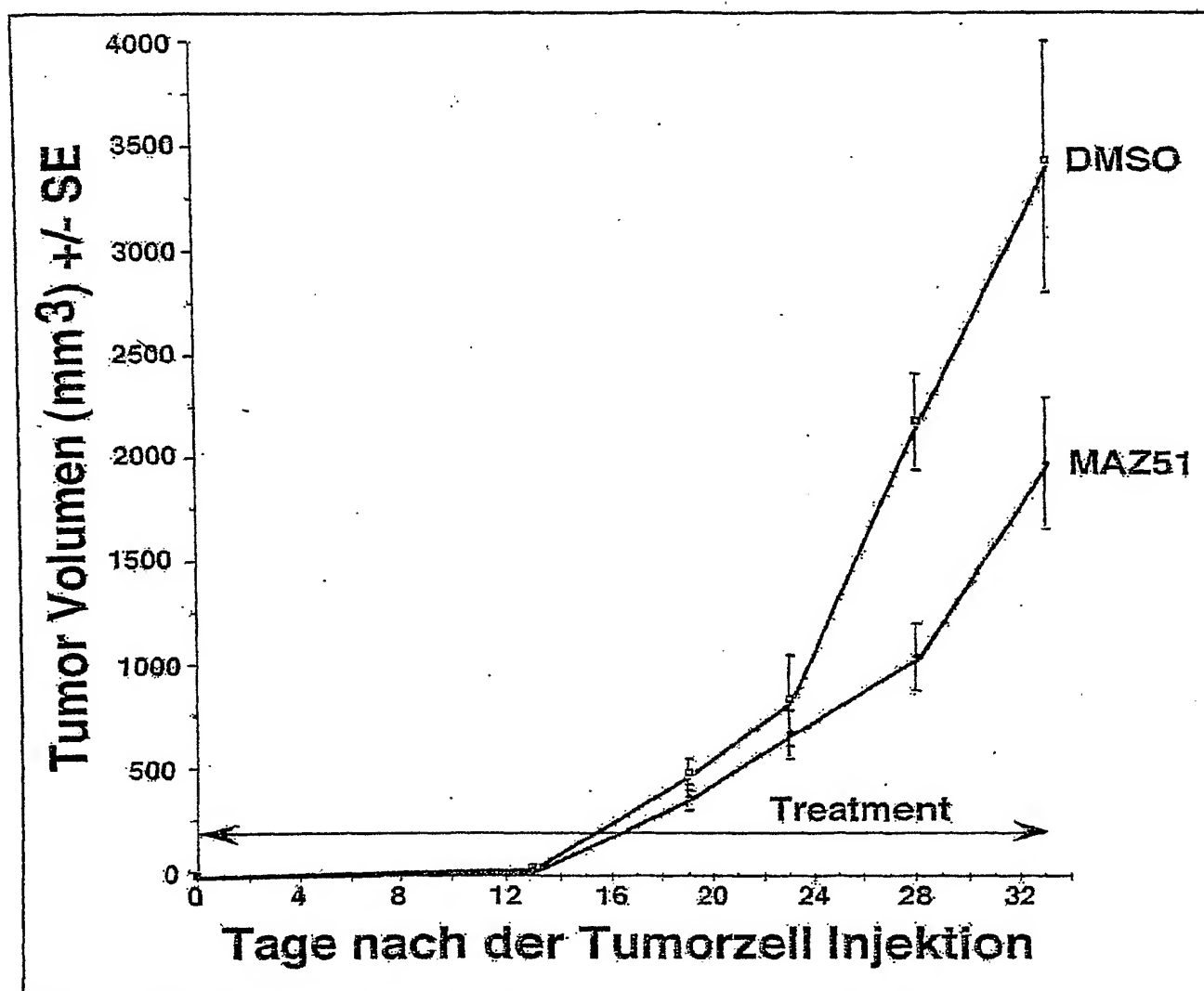
Figur 6:



Figur 7:



Figur 8:



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/07778

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/404 C07D209/34 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07D A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, WPI Data, EPO-Internal, BEILSTEIN Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 10325 A (GLAXO GROUP LTD ;HARRIS PHILIP ANTHONY (US); MCNUTT ROBERT WALTON) 4 March 1999 (1999-03-04) examples 46-50	1-10
Y	WO 96 40116 A (SUGEN INC) 19 December 1996 (1996-12-19) page 1-5; claim 1	1-10
Y	BLUM ET AL.: "Substrate competitive inhibitors of IGF-1 receptor kinase" BIOCHEMISTRY, vol. 39, no. 51, 2000, pages 15705-12, XP002215776 table 2A	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification)
- *C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *S* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 October 2002

Date of mailing of the international search report

23/10/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lauro, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/07778

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 07695 A (HIRTH KLAUS PETER ; SHAWVER LAURA KAY (US); SUGEN INC (US); TANG PE) 26 February 1998 (1998-02-26) page 101	1-10
X	----- DATABASE CROSSFIRE BEILSTEIN 'Online! Beilstein Institut zur Förderung der Chemischen Wissenschaften, Frankfurt am Main, DE; retrieved from BEILSTEIN, accession no. 231732 XP002215778 abstract & WAHL; BAGARD: BULL. SOC. CHIM. FR. , vol. 4, no. 5, 1909, page 1038	1-4
X	----- EP 0 632 102 A (BAYER AG) 4 January 1995 (1995-01-04) example 41	1-4
A	----- HAMADA K ET AL: "VEGF-C SIGNALING PATHWAYS THROUGH VEGFR-2 AND VEGFR-3 IN VASCULOANGIOGENESIS AND HEMATOPOIESIS" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPAGNY, ORLANDO, FL, US, vol. 12, no. 96, 2000, pages 3793-3800, XP002952145 ISSN: 0006-4971 the whole document	1-10
P,X	----- V. KIRKIN ET AL.: "Characterization of indolinones which preferentially inhibit VEGF-C and VEGF-D-induced activation of VEGFR-3 rather than VEGFR-2" EUR. J. BIOCHEM., vol. 268, November 2001 (2001-11), pages 5530-40, XP002215777 figure 5	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/07778

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9910325	A	04-03-1999	AU 9158498 A	16-03-1999
			WO 9910325 A1	04-03-1999
			EP 1003721 A1	31-05-2000
			JP 2002514228 T	14-05-2002
			US 6268391 B1	31-07-2001
			ZA 9807037 A	07-02-2000
WO 9640116	A	19-12-1996	US 5880141 A	09-03-1999
			AT 200863 T	15-05-2001
			AU 706597 B2	17-06-1999
			AU 6044196 A	30-12-1996
			BR 9606410 A	30-12-1997
			CA 2192797 A1	19-12-1996
			DE 29623744 U1	30-09-1999
			DE 69612649 D1	07-06-2001
			DE 69612649 T2	31-10-2001
			DK 769947 T3	13-08-2001
			EP 0769947 A1	02-05-1997
			EP 0934931 A2	11-08-1999
			ES 2159741 T3	16-10-2001
			HU 9701694 A2	28-06-1999
			JP 2000026412 A	25-01-2000
			JP 10504323 T	28-04-1998
			JP 3231044 B2	19-11-2001
			NO 965377 A	12-02-1997
			NZ 310109 A	28-01-1999
			PT 769947 T	31-10-2001
			WO 9640116 A1	19-12-1996
			US 6225335 B1	01-05-2001
			US 6316635 B1	13-11-2001
			US 5792783 A	11-08-1998
			US 5883116 A	16-03-1999
			US 5834504 A	10-11-1998
			US 5886020 A	23-03-1999
			US 5883113 A	16-03-1999
			US 2001027207 A1	04-10-2001
			US 2002102608 A1	01-08-2002
WO 9807695	A	26-02-1998	AU 4155697 A	06-03-1998
			EP 0929520 A1	21-07-1999
			JP 2001503736 T	21-03-2001
			WO 9807695 A1	26-02-1998
			US 2002102608 A1	01-08-2002
EP 0632102	A	04-01-1995	DE 4321420 A1	05-01-1995
			DE 4340560 A1	01-06-1995
			DE 59402281 D1	07-05-1997
			EP 0632102 A1	04-01-1995
			JP 7018586 A	20-01-1995
			US 5626633 A	06-05-1997

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K31/404 C07D209/34 A61P35/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

8. RECHERCHIESTE GEBIETE

Fachbereichlicher Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K C07D A61P

Forscherteile aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die rechnerisierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, WPI Data, EPO-Internal, BEILSTEIN Data

CO-40322-01

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 99 10325 A (GLAXO GROUP LTD ;HARRIS PHILIP ANTHONY (US); MCNUTT ROBERT WALTON) 4. März 1999 (1999-03-04) Beispiele 46-50 -----	1-10
Y	WO 96 40116 A (SUGEN INC) 19. Dezember 1996 (1996-12-19) Seite 1-5; Anspruch 1 -----	1-10
Y	BLUM ET AL.: "Substrate competitive inhibitors of IGF-1 receptor kinase" BIOCHEMISTRY, Bd. 39, Nr. 51, 2000, Seiten 15705-12, XP002215776 Tabelle 2A -----	1-10
	----- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ **St. Anthony Padelford**

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

*E) Stilles Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Annahetextum veröffentlicht worden ist

*1. Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie auszufüllen)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Auskunft, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

*pe Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

¹² Systematische Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist.

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

*) Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* Veröffentlichung, die Minder derselben Patenrfamilie ist

Datum des Abschlusses der alternativen Recherche

7. Oktober 2002

Abstractdatum des internationalen Rechercheberichts

23/10/2002

Name und Postanschrift der internationalen Forschungsbehörde
Europäisches Patentamt, P.O. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Notar

Lauro, A.

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 98 07695 A (HIRTH KLAUS PETER ; SHAWVER LAURA KAY (US); SUGEN INC (US); TANG PE) 26. Februar 1998 (1998-02-26) Seite 101	1-10
X	--- DATABASE CROSSFIRE BEILSTEIN 'Online! Beilstein Institut zur Förderung der Chemischen Wissenschaften, Frankfurt am Main, DE; retrieved from BEILSTEIN, accession no. 231732 XP002215778 Zusammenfassung & WAHL; BAGARD: BULL. SOC. CHIM. FR. , Bd. 4, Nr. 5, 1909, Seite 1038	1-4
X	--- EP 0 632 102 A (BAYER AG) 4. Januar 1995 (1995-01-04) Beispiel 41	1-4
A	--- HAMADA K ET AL: "VEGF-C SIGNALING PATHWAYS THROUGH VEGFR-2 AND VEGFR-3 IN VASCULOANGIOGENESIS AND HEMATOPOIESIS" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPAGNY, ORLANDO, FL, US, Bd. 12, Nr. 96, 2000, Seiten 3793-3800, XP002952145 ISSN: 0006-4971 das ganze Dokument	1-10
P,X	--- V. KIRKIN ET AL.: "Characterization of indolinones which preferentially inhibit VEGF-C and VEGF-D-induced activation of VEGFR-3 rather than VEGFR-2" EUR. J. BIOCHEM., Bd. 268, November 2001 (2001-11), Seiten 5530-40, XP002215777 Abbildung 5 -----	1-10

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl der Anspruch 10 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 8.4 a) abgetaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Abkürzungen

PCT/EP 02/07778

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9910325 A	04-03-1999	AU 9158498 A	16-03-1999
		WO 9910325 A1	04-03-1999
		EP 1003721 A1	31-05-2000
		JP 2002514228 T	14-05-2002
		US 6268391 B1	31-07-2001
		ZA 9807037 A	07-02-2000
WO 9640116 A	19-12-1996	US 5880141 A	09-03-1999
		AT 200863 T	15-05-2001
		AU 706597 B2	17-06-1999
		AU 6044196 A	30-12-1996
		BR 9606410 A	30-12-1997
		CA 2192797 A1	19-12-1996
		DE 29623744 U1	30-09-1999
		DE 69612649 D1	07-06-2001
		DE 69612649 T2	31-10-2001
		DK 769947 T3	13-08-2001
		EP 0769947 A1	02-05-1997
		EP 0934931 A2	11-08-1999
		ES 2159741 T3	16-10-2001
		HU 9701694 A2	28-06-1999
		JP 2000026412 A	25-01-2000
		JP 10504323 T	28-04-1998
		JP 3231044 B2	19-11-2001
		NO 965377 A	12-02-1997
		NZ 310109 A	28-01-1999
		PT 769947 T	31-10-2001
		WO 9640116 A1	19-12-1996
		US 6225335 B1	01-05-2001
		US 6316635 B1	13-11-2001
		US 5792783 A	11-08-1998
		US 5883116 A	16-03-1999
		US 5834504 A	10-11-1998
		US 5886020 A	23-03-1999
		US 5883113 A	16-03-1999
		US 2001027207 A1	04-10-2001
		US 2002102608 A1	01-08-2002
WO 9807695 A	26-02-1998	AU 4155697 A	06-03-1998
		EP 0929520 A1	21-07-1999
		JP 2001503736 T	21-03-2001
		WO 9807695 A1	26-02-1998
		US 2002102608 A1	01-08-2002
EP 0632102 A	04-01-1995	DE 4321420 A1	05-01-1995
		DE 4340560 A1	01-06-1995
		DE 59402281 D1	07-05-1997
		EP 0632102 A1	04-01-1995
		JP 7018586 A	20-01-1995
		US 5626633 A	06-05-1997

